

透析液配管のバイオフィームに関する基礎的検討

砂子澤裕 竹澤真吾

A Basic Review of the Biofilm Component In the Dialysate Plumbing System

Yutaka ISAKOZAWA Shingo TAKESAWA

Abstract

It has been pointed out that bio-active substances such as Endotoxins can find their way into the dialysate plumbing system, central to dialysis treatment. For that reason, a wide range of measures have been undertaken regarding dialysate purification in order to ensure that water quality management does not pose a problem. In modern dialysis treatment, dialysate water quality has improved dramatically, thereby reducing the threat of long-term complications to patients, yet the preponderance of Endotoxin substances remain. In the present dialysis system, the foramen magnum diameter film is considered to be the mainstream method. In reverse filtration and back diffusion, however, dialysate pollutants flowing with the blood stream is confirmed to have potentially-serious dangers to patients. When polluted substances caused by Endotoxins are included in the vivo, and the presence of Endotoxins in the dialysate membranes, dialyzer materials and liquid medicines must at all times be avoided. Therefore, the pivotal task hinges on the aseptical maintenance of the dialysate line, and specifically how to grasp it accurately in order to prevent the propagation of bacterial substances. Also, this study found no constant correlation between Endotoxin value and clinical signs, the complications of Endotoxins origins have not been confirmed with respect to water quality management. Moreover, in recent years, micro-organisms in the Endotoxins with the exception of Gram-negative bacteria and the formation of bacterial elements in the biofilm have attracted public attention. To establish line management using the washing method, the washing time appropriate to the water treatment equipment and dialysate plumbing is of central importance in order to ensure water quality in dialysate purification. To ensure dialysate purification in order to achieve QOL improvement in the vital prognosis of patients in every dialysis facility, improving the awareness of clinical-based managing staff is indispensable both to water quality and line management.

key words : Water Quality Management, Line Management, Biofilm, Endotoxin.

キーワード：水質管理, ライン管理, バイオフィーム, エンドトキシン

2007.11.12受理

はじめに

1. 透析液水質管理基準

透析合併症の一つである透析アミロイドーシスの前駆物質が β_2 -ミクログロブリンであることが発見されて以来、低分子タンパクの除去性能を向上させるため、大孔

径透析膜の開発が積極的に行われている。また、透析療法も多様化し大量液置換、on-line HDFなどが施行されてきたが、その一方で膜孔径の拡大にともないエンドトキシン（以下、ET）をはじめとする透析液中の汚染物質が逆濾過、逆拡散により生体内に流入することが危惧されている¹⁻³⁾。

これらの背景により、1994年、九州HDF研究会において透析液水質管理基準⁴⁾が提唱されて以来、数々の変遷をたどってきた(表1)。2001年日本透析医学会では透析液水質管理基準の低減化が提案⁵⁾され、さらに、2004年日本透析医学会においてET濃度が検出感度以下であっても細菌培養により菌が検出するとの報告があ

り、ET濃度の最大許容量を現状維持の50EU/l未満、達成目標濃度を検出感度以下と定めた⁶⁾。現在では、国際標準化機構(International Organization for Standardization; ISO)により国際基準の策定が検討されている⁷⁾。

表1 透析液水質管理基準の変遷^{4~6)}

	九州 HDF 研究会 (1994 年)	JSDT (1995 年)	JSDT (1998 年)	JSDT (2001 年)	JSDT 案 (2004 年)
透析液 ET 濃度					
最大許容濃度	50EU/l 未満	250EU/l 未満	—	50EU/l 未満	50EU/l 未満
達成目標濃度	10EU/l 未満	100EU/l 未満	—	10EU/l 未満	検出感度以下
バクテリア数	規定なし	100CFU/ml 未満	—	規定なし	規定なし
置換液 ET 濃度					
許容濃度	1EU/l 未満	—	1EU/l 未満	—	—
バクテリア数	規定なし	—	10 ⁻⁸ CFU/ml 未満	—	—

2. 現在の配管の洗浄

現在の配管洗浄は、透析液排液による細菌増殖と配管内析出物質の除去を目的とし行われており、その基本工程は、水洗_薬洗_封入_水洗となっている。洗浄消毒には様々な種類のものが用いられており、また各透析施設の使用洗浄剤、使用状況、頻度は様々であり、統一されていないのが現状である。その特徴を以下に示す。

1) 消毒薬

次亜塩素酸ナトリウム(0.02~0.05%)が安価だが、金属腐食性や有機物存在下での効果低下がある。

2) 酸洗浄

酢酸(1%以下)、塩酸(1%以下)、クエン酸(1%以下)は炭酸塩溶解性が高い。

3) タンパク除去

消毒薬に加えて界面活性剤などが入っており、洗浄作用が強いが、水洗を多くする必要がある。

4) 消毒+酸洗浄

消毒薬と酸洗浄の効果を併せ持つと同時に金属腐食性を抑えている。

5) 酸性電解水

強酸性電解水と弱酸性電解水がある。金属腐食性や有機物存在下での効果低下がある。

3. 透析液ライン管理の基本原則

配管内面に汚染巣が付着しないよう、屈曲、接続、分岐、段差を必要最低限とし、高低差をなくす。デッドス

ペースを残さないようにし、微少な凹凸も最小限にとどめるように配管を単純化する。ラインはできるだけ流水を保持するようし、停止させた場合、停滞水を汚染水とみなして排出し、十分に流水で洗い流す。配管内のあらゆる部分に細菌が存在するので消毒もあらゆる部位に及ばなければならない。薬液の濃度が希釈されがちな配管の末端においても有益な消毒が行われるよう完全な消毒に配慮する。消毒の条件として、人体に無害で、殺菌性が強く、残留性がない、長時間貯留しても機器や配管材質の化学劣化を起こさないことが必須である。また、ラインの停滞時に細菌汚染は進行するので、停滞時には消毒薬を充填しておくことが細菌増殖を抑制し、バイオフィームなど汚染巣の形成の防止にも役立つ。長時間の消毒薬停滞で配管や機器の材質である金属などが化学劣化しないことを確認する必要がある。

4. バイオフィーム^{8~12)}

バイオフィームとは微生物が排泄するスライムで囲まれた微生物の集合体であり、自動力のない表面または生きた表面に付着している。バイオフィームは水があるところならどこでも、形成する可能性がある。バイオフィームが発育することにより、肉眼で確認することができるようになり、水道管の内部をコーティングしたりする。バイオフィームの例としては歯の上に付いたプラークなどがある。すべての細菌の99%以上はバイオフィーム内部に住んでおり、中には有益な細菌もある。一般的にバイオフィームは配管を腐食させたり、水フィルターを

詰まらせたり、飲料水を汚染させる細菌を保持したりすることにより問題を起す。

バイオフィームの消毒法について見ると、配管壁面へ付着したバイオフィームに対して、消毒薬は境界層を経てバイオフィームに到達する。消毒薬の効果は濃度拡散係数によって左右され、消毒薬がバイオフィーム中の細菌細胞に到達するには、消毒薬が高濃度であり、長時間対象となる部分に接触している必要がある。また、バイオフィームは化学処理または物理的処理によって除去、破壊することができる。化学的殺菌剤は酸化性殺菌剤と非酸化性殺菌剤に分けられる。物理的処理には機械的なかきとりと熱による破壊がある。バイオフィームを伴う細菌は浮遊微生物以上に殺菌や配管表面からの除去が困難である。Characklis¹³⁾によると、多くの研究者により塩素処理ののちに急速な生物汚染の再開が発生することが観察されている。バイオフィームの不完全除去は、消毒後の総菌数のリバウンドを引き起す。

バイオフィームの付着と発育に影響するファクターとして表面材料、表面積、表面の滑らかさ、流速などが挙げられる。表面材料はバイオフィームの発育にほとんどまたは全く影響しない。Mayette¹⁴⁾によると、微生物が付着できない配管材料は見られていないとの報告がある。純水システムにおけるバイオフィームの発育に影響する一つの重大なファクターに表面積がある。これは、バイオフィームが付着可能な表面積が大きいことで、ROモジュール、イオン交換樹脂、配管システムは細菌の付着と発育に適した表面を提供している。滑らかな表面は細菌の付着を遅らせる。滑らかさは表面に付着するバイオフィームの総量にはさほど影響しないが、Meltzer¹⁵⁾によると、表面構造は汚染の速さに影響するが、暴露の最初の数時間に限られており、滑らかな表面は粗い表面よりも最初の汚染速度は遅いが、バイオフィーム形成は避けられないとの報告がある。また、速い水流速度では、バイオフィームの発育を変化させるが、細菌の配管表面への付着を防止できない。この結論はPatterson¹⁶⁾、Meltzer¹⁵⁾らによって得られている。速い流速では、境界層における遅い流れ、強力な付着、バイオフィームの厚さ、密なバイオフィームなどの理由により細菌の付着防止や既存バイオフィームの除去はなされない。

対象および方法

三重県某透析施設のリプレース前のROおよび透析液配管を頂き、各配管表面の汚染状況を観察した。また、汚染状況から見た従来の透析液配管洗浄方法の検討も同

様に行った。

1. 配管の肉眼的観察

観察した配管は、流れが乱れる部分の配管で、それを切断し表面を肉眼で観察した。

2. 配管の電子顕微鏡的観察

配管表面およびバイオフィームの厚みを電子顕微鏡で観察した。バイオフィームの厚みは、切断面が重要となるため配管表面部分を糸鋸で薄く切り取り、切断面に少し傷をつけ、液体窒素に浸し、引きさくことで切断した。

3. 切断配管の洗浄

採取、切断した配管をシャーレの中で次亜塩素酸、酢酸（共に原液）に1週間浸けた後、RO水で洗浄し配管表面の観察を行った。また、切断した配管を三角フラスコに次亜塩素酸・酢酸の原液とともに入れ、加温スターラーを用い、流れを作り、1時間沸騰攪拌した。その後、RO水で洗浄し表面の観察を肉眼および電子顕微鏡にて行った。

結果

1. 配管の肉眼的観察結果

図1、2に各配管の肉眼的観察結果を示す。RO配管、透析液配管ともに白い付着物が見られた。また、この付着物は配管内で流れの乱れる場所に多くみられ、比較的容易に削ることができた。

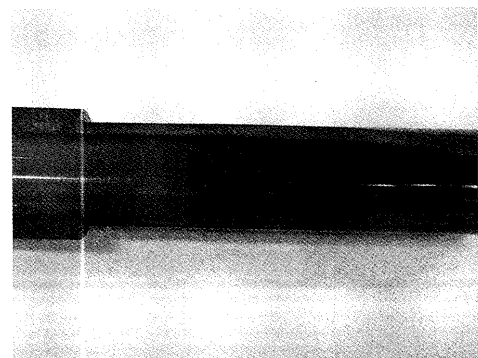


図1 RO配管のL字管後のストレート管側面

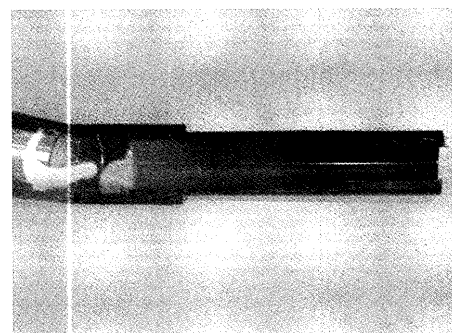


図2 透析液配管のエルボ管の側面

2. 電子顕微鏡的観察の結果

コンソール直前のホース表面を電子顕微鏡で観察すると、多くの付着物が幾重にも重なっている様子が観察された(図3)。この付着物は、コンソール直前の部位であることから、蓄積した炭酸カルシウムであると考えられた。

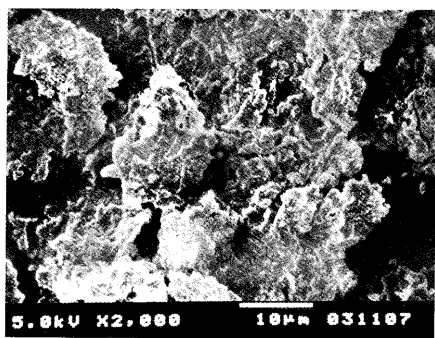


図3 コンソール直前のホース表面の拡大図 (×2,000)

さらにホースを酢酸で洗い流すと、表面の付着物が取り除かれたように観察された。酢酸洗浄で表面の大きな付着物は取り除かれているが、実際には細かな付着物が残っていた。つまり、バイオフィルムの表面に炭酸カルシウムが付着しており、酢酸洗浄で除去されたがその奥に潜むバイオフィルムは除去されていないことが確認された。図4はバイオフィルムの厚みを見たもので、配管、バイオフィルム、表面物質(細菌の死骸などの蓄積物)の三層で構成されていることがわかる。細菌部分の厚みは30 μ m程度である。

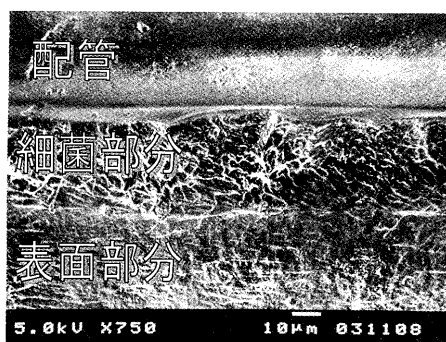


図4 バイオフィルムの厚み (×750)

3. 切断配管洗浄の結果

図5は、未洗浄の配管と次亜塩素酸洗浄を行った配管の比較であるが、肉眼での洗浄効果は見られなかった。また、酢酸洗浄も同様の結果を示した。このことから従来の洗浄では、一度付着したバイオフィルムに対しての洗浄が不完全であるといえる。図6は高温洗浄前の配管である。これを更に切断し実験を行った。

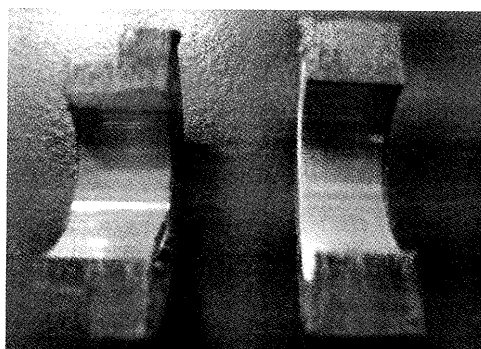


図5 未洗浄(左)と次亜塩素酸洗浄(右)後の配管

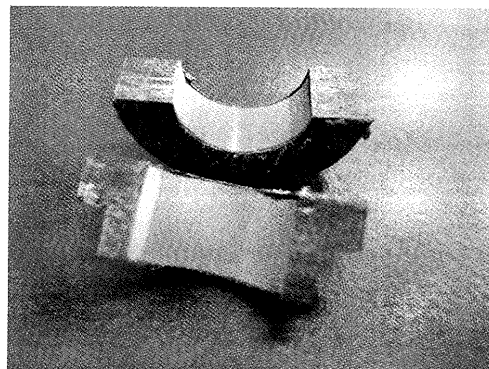


図6 高温での次亜塩素酸洗浄前の配管

図7は未洗浄と次亜塩素酸高温洗浄の結果であるが、肉眼では高い洗浄効果を示した。

図8は洗浄前の配管表面の様子で、かなりの付着物が見られた。

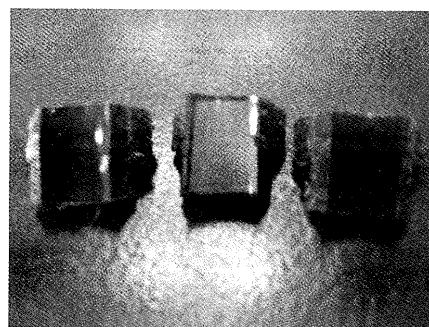


図7 高温での次亜塩素酸洗浄後(左右)未洗浄(中央)

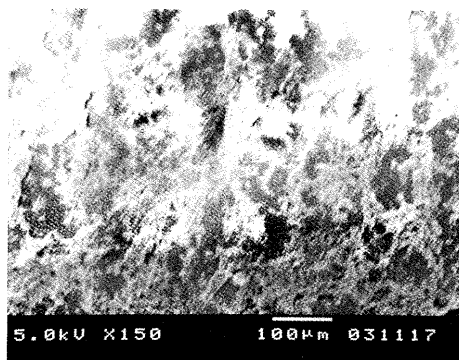


図8 洗浄前の透析液配管表面 (×150)

図9は図7の洗浄済み配管表面を電子顕微鏡で観察した結果である。肉眼で洗浄効果はあるように思われたが、多くの付着物が残っている様子が見られた。図10は未洗浄と酢酸高温洗浄の結果である。肉眼では白みが減少し、次亜塩素酸と同様に洗浄効果が認められた。

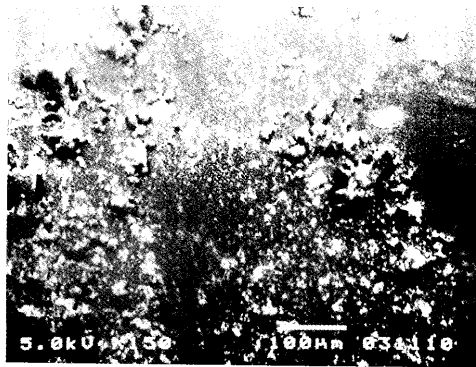


図9 高温での次亜塩素酸洗浄後の配管表面 (×150)

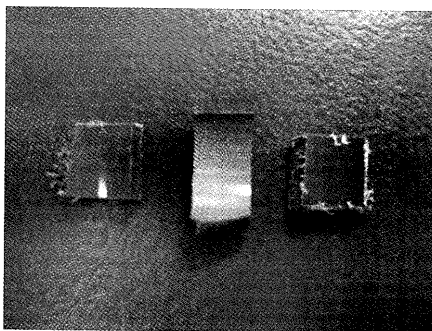


図10 高温での酢酸洗浄後の配管表面 (中央は未洗浄)

図11は図10の洗浄済み配管の表面である。表面に付着しているのは電子顕微鏡への配置時に付着したゴミと思われる。また、倍率が350倍と高くなっているが、これは低倍率では付着物がほとんど見られなかったためである。高温での酢酸洗浄は次亜塩素酸洗浄以上に洗浄効果が高いことがわかる。なお、倍率を1,000倍程度まで拡大したが付着物は見られなかった。



図11 高温での酢酸洗浄後の配管表面 (×350)

考察

配管に付着した白い皮膜だが、削ることが可能であること、配管を作成した業者がコーティングは施していないこと、水の流れが乱れる場所で濃度が高いこと、次第に尾を引くように消えることから、菌によってもたらされたバイオフィームとカルシウム層ではないかと推測された。

また、このような付着物が発生していることを考慮すると、これまで使用されてきた洗浄方法では、十分な洗浄がされていないということが考えられる。

肉眼で観察された透析液配管内での流れの乱れによるバイオフィームの形成は、線速度が均一で高い直線部分では少ない傾向にある。また、洗浄時において流速が0に近い状態では拡散とクリープ流れによる混合での薬液濃度の均一化が期待できるため、夜間での次亜塩素酸等の封入や低流速での循環などを行うことで菌の繁殖抑制効果が期待できると考えられる。

電子顕微鏡での観察では、肉眼で付着物の見られた部分の観察において、バイオフィームが見られた。配管の洗浄実験では、通常の酢酸洗浄や次亜塩素酸では洗浄の効果はほとんど得られなかった。熱を加えての次亜塩素酸洗浄では、表面のバイオフィームや付着物は除去可能だが、電子顕微鏡レベルで除去は十分にはなされていなかった。一方、熱を加えての酢酸洗浄においてバイオフィームが除去されている様子が見られた。このことから、従来の洗浄方法では、配管内のバイオフィームの除去は困難と考えられ、洗浄で残留したバイオフィームがより強固なバリアを張ることや、より短時間でのバイオフィームの形成が起こることが予想される。

熱を加えることでかなりの洗浄効果の向上が見られ、前述した次亜塩素酸封入などの持続的な洗浄によるバイオフィーム形成の遅延に加えての高温、高濃度の薬物による洗浄が有効であると考えられる。

結語

透析液およびRO配管には流れのみだれが存在し、バイオフィーム形成の要因となっており、従来の洗浄方法では十分な洗浄がなされていなかった。熱を加えての次亜塩素酸洗浄では、表面のバイオフィームは除去可能だが、完全除去はできていなかった。また、酢酸高温洗浄ではバイオフィームが除去されていた。

対策として高温での洗浄で極力細菌数を減少させ、低

流速で長時間の次亜塩素酸封入で細菌数増加を抑える洗浄方法が有効と思われる。低流速での高濃度洗浄消毒法や高温での消毒における封入薬の適切な濃度や温度は、配管への影響と洗浄効果の兼ね合いから定めることが困難であり、今後このような技術の発展および最適な規格の制定に関する研究が必要である。

参考文献

- 1 Pacitti, A., Tetta, C., Mangiarotti, G., et al.: Beta-2-microglobulin serum profiles in different settings of mass transport and fluid pyrogen content. *Kidney Int* 41(Suppl) :S96-99, 1993.
- 2 David, S., Tetta, C., Canino, F., et al. : Production of platelet activating factor by human neutrophils after backfiltration of endotoxin contaminated dialysate. *ASAIO J* 39, pp.773-777, 1993.
- 3 Urena, P., Herbelin, A., Zingraff, J., et al.: Permeability of cellulosic and non-cellulosic membranes to endotoxin subunits and cytokine production during in-vitro hemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 7, pp.16-28, 1992.
- 4 Sato, T., Koga, N.: Centralized on-line hemodiafiltration system utilizing purified dialysate as substitution fluid. *Artif. Organs* 22, pp.285-290, 1998.
- 5 第46回日本透析医学会コンセンサスカンファレンス「新たな透析液安全基準の設定」. 透析会誌34: 637-638, 2001.
- 6 川西秀樹, 峰島三千男, 竹澤真吾, 他: 新たな透析液水質基準と血液浄化器の機能分類, 第49回日本透析医学会コンセンサスカンファレンス「血液浄化器の新分類〜内部濾過と透析液水質による再評価」. 透析会誌38: 149-154, 2005.
- 7 ISO/CD 23500: Fluids for hemodialysis and related therapies, 2005.
- 8 Potera, C.: Biofilms Invade Microbiology, *Science* 273, pp.1795-1797, 1996.
- 9 Coghlan, A.: Slime City, *New Scientist* 15, pp.32-36, 1996.
- 10 LeChevallier, M., Cawthon, C., Lee, R.: Inactivation of Biofilm Bacteria, *Applied and Environmental Microbiology* 54, pp. 2492-2499, 1988.
- 11 LeChevallier, M., Lowry, C., Lee, R., et al.: Examining the Relationship Between Iron Corrosion and the Distribution of Biofilm Bacteria, *Journal AWWA* 85, pp. 111-123, 1993.
- 12 Costerton, J., Lewandowski, Z., Caldwell, D., et al.: Microbial Biofilms, *Annual Reviews of Microbiology* 49, pp. 711-745, 1995.
- 13 Characklis, W., Marshall, K. : Biofilms, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1990.
- 14 Mayette, D. : The Existence And Significance Of Biofilms In Water, *Water Review*, pp. 1-3, Water Quality Research Council, 1992.
- 15 Meltzer, T.: High-purity Water Preparation for the Semiconductor, Pharmaceutical, and Power Industries. Tall Oaks Publishing, Inc., Littleton, 1993.
- 16 Patterson, M., Husted, G., Rutkowski, A., et al.: Isolation, Identification, and Microscopic Properties of Biofilms in High-Purity Water Distribution Systems, *Ultrapure Water* 8, pp. 18-24, 1991.